

フグ毒生産細菌と天然同族体の研究

著者	四津 まり
号	376
発行年	1989
URL	http://hdl.handle.net/10097/17070

氏 名(本籍) 四 津 ま り

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 3 7 6 号

学位授与年月日 平 成 元 年 11 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 フグ毒生産細菌と天然同族体の研究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教授 安元 健

教授 目黒 熙

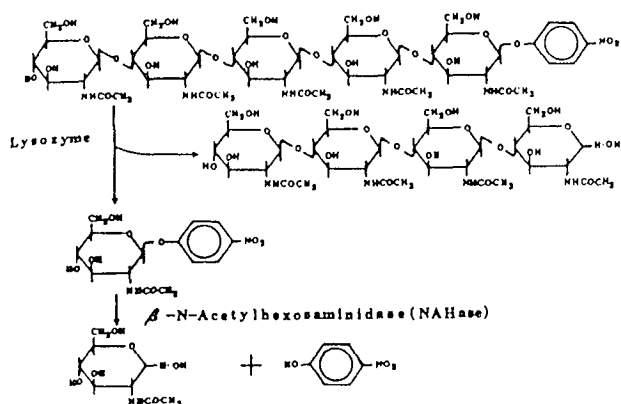
教授 藤本健四郎

論文内容要旨

序 論

フグの毒テトロドトキシン(TTX, Fig.1, 1)は、フグを賞味するわが国において最も有名な天然毒のひとつである。構造決定と全合成が遂行されて以降の研究は起源や生合成、及び生理活性に重点が置かれた。TTXはフグ以外にも、多種多様な生物から発見され、その起源が注目された。当研究室では高感度、特異的にTTX関連化合物を分析するHPLC-蛍光分析装置を開発し、これを用いて食物連鎖の下位をたどり、藻食魚、カニ、海藻などからTTXを新たに発見し、さらに、カニや海藻に付着するTTX生産菌を見い出した。この事実は、フグのTTXも細菌起源である可能性を示唆した。TTXの生合成や代謝については今だに未知である。一方、TTXが細胞内へのNaイオンの流入を特異的に阻害することが明らかにされ、現在、薬理試薬として汎用されている。しかし、TTXは複雑な化学構造を持つので特定基を化学修飾して同族体を合成することは著しく困難であり、構造活性相関研究に有用である新奇構造をもつ天然同族体の発見が切望されている。特に、カエル毒chiriquitoxin(CHTX)はNa, K両チャンネルに作用することが報告され、構造決定が期待された。本研究では、フグにおけるTTX生産菌のスクリーニング、イモリから単離した新同族体の構造決定、新同族体の分析法の確立、分布調査、CHTXの構造の推定を行い、TTXの生合成や代謝経路について、また、6位の置換基の活性に及ぼす影響について考察した。

Fig. 14



Assay System of Lysozyme using PNP-(GlcNAc)₃

Table 3

Components	Volume(ml)	Final conc.
1. 420uM PNP-(GlcNAc) ₃	1.00	280 uM
2. 0.5 M Sodium citrate buffer (pH 5.0, 37°C)	0.30	0.10 M
3. NAHase from Jack Bean (4U/ml)	0.05	0.2 U
4. Distilled water	0.10	—
5. Lysozyme	0.05	—
(Total 1.50 ml)		
6. 1.0 M NaHCO ₃ solution	1.50	0.5 M

Standard Condition for Lysozyme-assay

Fig. 15

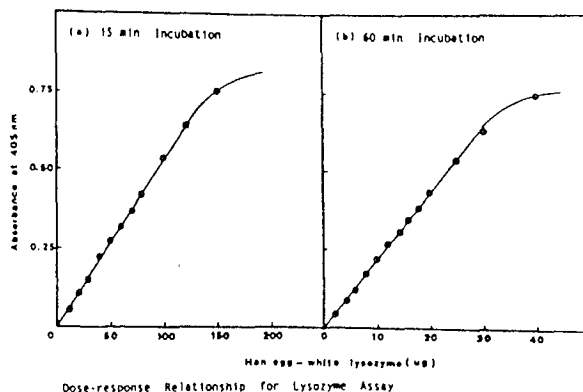
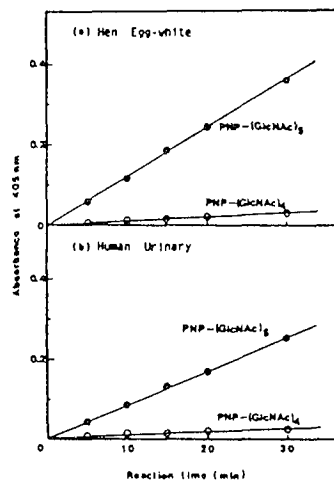


Fig. 16



Comparison of the Sensitivity of PNP-(GlcNAc)₃ with that of PNP-(GlcNAc)₄

Fig. 18

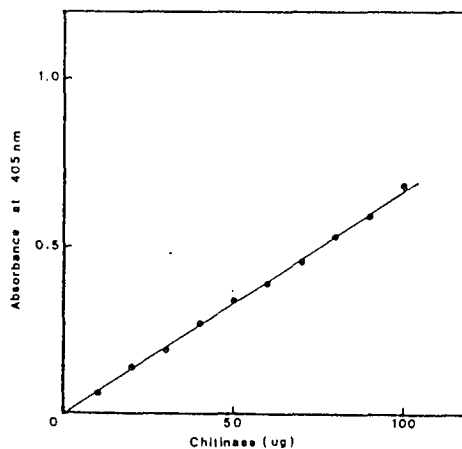
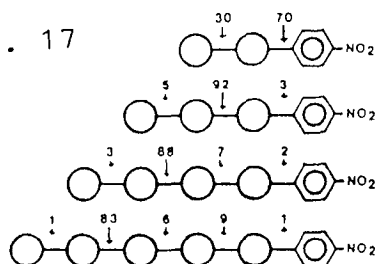


Fig. 17



審査結果の要旨

キチンはN-アセチルグルコサミンを単位とする多糖類の一種でエビ・カニ等の甲殻類の殻を構成する大きな未利用資源の一つである。南條文雄氏の論文はその高度利用を目的とし、キチンを加水分解するキチナーゼを微生物 (*Nocardia orientalis*) から精製し、同酵素を用いて6及び7糖からなるキチンオリゴ糖の製造に成功し、その酵素反応を明らかにした。同反応はキチナーゼによる糖の転移反応で、4糖からなるキチンオリゴ糖を基質として加えることにより第一段階として2糖に分解し、更に過剰の4糖に転位する事によって6糖からなるキチンオリゴ糖を合成するもので、キチナーゼの転移反応は、はじめて明らかにされたものである。同様にして同氏は5糖より7糖のキチンオリゴ糖の合成にも成功した。これらはいずれも高い収率で得られ、生成したオリゴ糖が不溶な事を利用して分離が容易で工業的な大量製造法も可能なすぐれた方法である。又同酵素を用い5糖オリゴ糖からそのP-ニトロフェニル誘導体を合成し、これを用いたリゾチーム及びキチナーゼの酵素活性法の開発を行った。同法は従来の測定法に比して夫々10~20倍の感度を持ち、血中及び尿中の量を測定することに応用可能で臨床分析法として重要な意味を持っている。これらの研究はキチンの利用法に新しい側面を切り拓くと共に酵素化学的にも新発見を含み、農学博士の学位に充分値するものである。

第一章 フグから分離した細菌のTTX生産能

1) Table 1に示したように、4種のフグから細菌を分離し、TTX分析装置を用いてTTX生産能のスクリーニングを行った結果、トラフグの腸内細菌1株、コモnfグの皮膚付着細菌2株がTTXまたはその同族体を生産する可能性が示された。

2) トラフグの腸内細菌を大量培養し、4,9-anhydroTTX画分を精製し、TTX分析装置とTLCで標品4,9-anhydroTTXと比較すると溶出位置とRf値が一致し(Fig.2)、本菌は4,9-anhydroTTXを生産することが強く示唆された。しかし、斜面培養保存中に死滅し、試料を追加してさらに確認することはできなかった。コモnfグ皮膚細菌2株が生産するTTX画分は、当研究室の山崎、目黒両氏の協力により精製し、アルカリ分解後に誘導化し、EI-MS, GC-MSによりTTX関連化合物であることを証明した。

3) コモnfグのTTX生産菌2株を海洋細菌の同定法に従って、それぞれ Pseudomonas sp.と Vibrio sp. と同定した。その後、東京大学清水潮教授により Pseudomonas sp. は新種の Alteromonas tetrodonisと命名され、Vibrio sp.は Listonella pelagia(Vibrio pelagius) biovar IIと同定された。

第二章 イモリの新TTX同族体

1) 沖縄産シリケンイモリ Cynops ensicauda 3.5kgから毒成分を抽出後、精製し (Fig. 3)、既知のTTX (1) 120 mg, 4-epiTTX (2) 15 mg, 4,9-anhydroTTX (3) 20 mgの他に未知成分A (6-epiTTX) (4) 18 mg, B (11-deoxyTTX) (5) 30 mg, C (4,9-anhydro-6-epiTTX) (6) 3 mg, D (11-deoxy-4-epiTTX) (7) 2 mg, E (4,9-anhydro-11-deoxyTTX) (8) 1 mgを各々単離した (Fig. 1)。物理化学的性状と毒性をTable 2に示す。まず、TTXの ^{13}C 及び ^1H NMRスペクトルのシグナルを帰属し (Table 3)、その比較により新同族体の構造を推定した。成分Aの分子式はTTXと一致していて、NMRスペクトルも非常にTTXと類似していたが、TTXのシグナルと比較すると、H-4a, H-8, CH_2 -11が0.24, 0.13, 0.28(0.30)ppm高磁場にシフトしていて (hemilactal型)、TTXの11- CH_2OH がaxial置換したための立体圧縮効果によると考え、6-epiTTXと推定した。 CH_2 -11(δ 3.74)を照射してNOEを測定すると、H-4a, H-8に各々、10.8%, 10.3%のNOEが観測され、また、H-4a(δ 4.17)を照射すると CH_2 -11に2.8%のNOEが観測されたことから推定構造が裏づけられた (Fig. 4)。Bは分子式からTTXのmonodeoxy体であることが考えられ、また、スピン系はTTXと一致していることが示された。TTXの CH_2 -11のシグナルの代わりに δ 25.1(^{13}C), 1.64(^1H)に CH_3 のシグナルが示され (hemilactal型)、またC-5, C-7が3.7, 3.9 ppm低磁場に、C-6, H-5, H-7が2.4, 0.17, 0.17 ppm高磁場

シフトしていて TTX の 11-CH₂OH が CH₃ に還元したためと考えられたので、B は 11-deoxyTTX であると推定した。TTX と同様に CH₃-11 と H-4a 間に NOE が観測されなかったので 6 位の立体は TTX と同じ S 型であると推定した。6-epiTTX と 11-deoxyTTX (Fig. 5) は NOESY で飽和移動が示され、TTX と同様に hemilactal 型と 10,7-lactone 型の平衡混合物として存在することが示され、その比は 4%CD₃COOD/D₂O 中でそれぞれ 6:4, 7:3 であった。3 種の微量成分である C, D, E は既知の TTX 同族体の ¹H NMR スペクトルデータ (Table 4) と比較し、各々、4,9-anhydro-6-epiTTX, 11-deoxy-4-epiTTX, 4,9-anhydro-11-deoxyTTX と帰属した。

2) その後フグから発見された 11-norTTX-6(R)-ol(9) を含めた TTX の同族体 1~9 (Fig. 1) を分析するため、従来の TTX 分析装置の分析条件を改良した。TTX 群, 6-epiTTX 群と 11-norTTX-6(R)-ol は同時に分析できるが、11-deoxy-TTX 群には別の条件を設定した (Table 5, Fig. 6, 7)。

TTX, 6-epiTTX, 11-deoxyTTX, 11-norTTX-6(R)-ol の検出限界は各々 10.6 ng, 1.2 ng, 20.4 ng, 12.6 ng であった。

3) 改良型分析装置を用いて、イモリ 9 種について TTX, 6-epiTTX, 11-deoxyTTX の分布を調べ、TTX が全種から、6-epiTTX が 6 種から、11-deoxyTTX が 5 種から検出された (Table 6)。シリケンイモリの各組織中の毒の含量を比較すると雄では皮、雌では皮と卵巣に毒が集中していた

(Table 7)。

4) その後、クサフグからも 6-epiTTX や 11-deoxyTTX が単離、同定され、6-epiTTX や 11-deoxyTTX が TTX の普遍的代謝物であることが示され、その構造から生合成経路を考察した。1, 2, 3, 4, 4a, 8a, 9, 10 位を構成するアルギニンと、残り 5, 6, 7, 8, 11 位を構成するの炭素 5 つの化合物 (C5 ユニット) からなると考え、6 位のエピ体の存在が明らかになったので、C5 ユニットとしては 6 位に sp_2 炭素を置くことができるイソブレンユニットを当てはめ、アルギニンと縮合後に酸化または水が付加して TTX, 6-epiTTX, 11-deoxy-TTX が生成する仮説を立てた (Fig. 8)。

第三章 chiriquitoxin (CHTX) の構造

1) コスタリカ産の矢毒蛙 Atelops chiriquiensis の皮 100 g から約 6 mg の CHTX (10) と 1 mg の TTX を単離し、物理化学的性状を調べた (Table 2)。高分解能 FABMS から分子式 $C_{13}H_{20}O_{10}N_4$ が得られ、ニンヒドリンで陽性であるので $-NH_2$ の存在が考えられ、FT-IR スペクトル (Fig. 9) でグアニジウム基 (1667cm^{-1})、 $COOH$ (1740cm^{-1} , +HCl) の存在が示された。各種 NMR スペクトルを測定してシグナルを帰属し (Table 8)、TTX のスペクトルと比較する H-4/H-4a, H-5/H-7, H-7/H-8, H-4a/H-9 のスピン系は TTX と一致して (Fig. 10)、 ^{13}C NMR スペクトルも TTX と類似していた。しかし、TTX の CH_2 -11 のシグナルが現れず、新たに $COOH$

(δ 174.1)と2つのCHのシグナル δ 58.0, 70.3 (^{13}C), δ 4.27, 4.90 (^1H)が現れ、その ^1H どうしが1.8Hzでカップリングしていた。これらのデータから、CHTXはTTXの11- CH_2OH が $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ または $\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ に変化した構造をもつと考えられた。CHTXを1% CF_3COOD , 4% $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 中で測定した ^1H NMRスペクトルのケミカルシフト(δ 値)を D_2O 中で測定した場合の δ 値と比較すると(Table 8)、 $\text{CH}(\text{NH}_2)$ に帰属される δ 4.27のシグナルが0.12ppm低磁場シフトしたが、他のシグナルのシフトは0.04ppm以下であったので、6位の置換基の構造を $\text{CH}(\text{NH}_2)$ が COOH に隣接する $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ と推定した。

2) CHTXを当モルの過ヨウ素酸で分解するとTTXの過ヨウ素酸分解物と同じ、11-norTTX-6,6-diolを生成することが高分解能FABMSで示され、CHTXがTTXと同じ骨格構造で、6,11-diol構造を持つことが確かめられた(Fig.11)。

3) また、CHTXを強酸中で保存するとCHTX-13,6-lactoneを形成することがFT-IRスペクトルの 1800cm^{-1} (+HCl)の吸収やNMRスペクトル解析の結果(Fig. 12, Table 8)示され、hemilactal型の互変異性体である10,7-lactoneの存在は示されなかった。CHTX-13,6-lactoneを1% CF_3COOD , 4% $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ 中にさらに放置すると、H-12が溶媒中のDと交換することがNMRスペクトル及びFABMSで示された。lactone環を開環してD化前のスペク

トルと比較して (Fig.13)、D化する¹HがCH(NH₂)に帰属されることを確認したので、CH(OH)CH(NH₂)COOHの構造が支持された。

4) 6,11,12位の立体について調べるためにCHTX-13,6-lactoneのNOE差スペクトルを測定すると、H-4aやH-8とH-11の間にNOEが観測されなかったので、6位はS型と考えられ、H-7を照射するとH-11, H-12の両方にNOEが観測され、H-5を照射しても両¹HにNOEが観測されなかったので (Fig.14), 11(R), 12(S)であると推定した。

総 括

フグ腸内及び皮膚付着細菌にTTX生産能が示され、フグのTTXの起源が細菌であることが示唆された。シリケンイモリから新たに6-epiTTXと11-deoxyTTXとそのエピ体、4,9-anhydro体を単離、構造決定し、既知同族体も含めて9成分を分析できるようTTX分析装置を改良した。6-epi-TTXと11-deoxyTTXはTTX含有生物に広く分布することがわかり、TTXの普遍的な代謝物であると考えられ、その構造からアルギニンとイソプレヌユニットが縮合した生合成経路と酸化代謝経路を仮定した。矢毒ガエル Atelops chiriquiensisに存在するchiriquitoxin(CHTX)はTTXの11-CH₂OHがCH(OH)CH(NH₂)COOHに変化している構造をもつと推定した。6-epiTTX, 11-deoxyTTX, CHTXは全てTTXの6位の変化した同族体であり、それらのマウス毒

性はTTXの2/3～1/7で、ともにNa, K両チャンネルとに作用することが示唆された(C.Y.Kao 私信)ので、6位の構造もTTXの活性発現に重要であるという知見を得た。

Table 1. Screening of bacteria for tetrodotoxin production.

Host animal				Bacteria	
species	date	prefecture no.	tissue	medium for isolation	no. of strains
Puffer fish					
<i>Fugu rubripes</i>	'85.3.16.	Yamaguchi	1 I	A	8
<i>Fugu niphobles</i>	'85.5.10.	Miyagi	1 I	A	8
<i>Fugu poecilonotus</i>	'85.6.18.	Miyagi	7 I	A	22
<i>Fugu poecilonotus</i>	'85.7.30.	Miyagi	5 S	A	6
<i>Fugu pardalis</i>	'86.4.7.	Miyagi	1 G,I,S	A	6,9,5
<i>Fugu pardalis</i>	'86.4.18.	Miyagi	1 I	A	8
<i>Fugu pardalis</i>	'86.5.30.	Miyagi	7 I,S	A	23,4
<i>Fugu poecilonotus</i>	'86.7.15.	Fukushima	4 I	A	25
Newt					
<i>Cynops ensicauda</i>	'87.7.24.	Okinawa	3 I,S	B,C,D	8,16

* Tissue: G, gill; I, intestine; S, skin

** Medium for isolation:

A; Nutrient Agar (Eiken) 35g + NaCl 25g / dist. water 1000 ml

B; Nutrient Broth "Nissui" 30g + Powdered Agar "Nissui" 15g / dist. water 1000 ml

C; Casein, from milk (Wako Pure Chemi. Indust.) 1g + Starch soluble 10g (Merck) + Powdered Agar "Nissui" 15g / dist. water 1000 ml

D; Polypeptone (Daigo Eiyokagaku) 5g + Yeast Extracts(Difco) 1g + Ferric (III) phosphate (Wako Pure Chem. Indust.) 0.1g + Powdered Agar "Nissui" 18g / dist. water 1000 ml

Table 2. Physico-Chemical Properties and Toxicity of 6-epiTTX, 11-deoxyTTX, CHTX and TTX

	6- <u>epi</u> TTX	11-deoxyTTX	CHTX	TTX
mp. (decomp.)	*	202°C	*	220°C
$[\alpha]_D^{25}$ (0.05N HCl)	-4.80	+5.37	-17.3	-3.8
(c)	0.33	0.34	0.075	1.17
FABMS(M+H) ⁺	320.1106	304.1155	393.1310	320.1048
calc.	320.1094	304.1145	393.1258	320.1094
Molecular formula	C ₁₁ H ₁₇ O ₈ N ₃	C ₁₁ H ₁₇ O ₇ N ₃	C ₁₃ H ₂₀ O ₁₀ N ₄	C ₁₁ H ₁₇ O ₈ N ₃
Toxicity (μg/kg)	60	71	14	10
(LD ₅₀ , mice, i.p.)				
Ninhydrine	-	-	+	-

* no crystal obtained

Table 3 NMR Spectral Data of TTX, 6-*epi*TTX, and 11-deoxyTTX^a

	TTX ^b				6- <i>epi</i> -TTX ^c				11-deoxyTTX ^c			
	hemilactal		lactone		hemilactal		lactone		hemilactal		lactone	
	C	H	C	H	C	H	C	H	C	H	C	H
2	156.6		155.9	—	156.5		155.8		156.4		—	
4	75.1	5.50 (d 9.4)	74.8	5.50 (d 9.4)	75.1	5.55 (d 9.4)	75.1	5.55 (d 8.9)	75.0	5.49 (d 9.4)	74.8	5.51 (d 9.6)
4a	40.7	2.35 (d 9.5)	46.5	2.35 (d 9.5)	41.8	2.01 (d 9.0)	46.9	2.13 (d 9.0)	40.5	2.37 (d 9.4)	46.2	2.37 (d 9.4)
5	73.8	4.25 (br s)	69.2	4.03	75.4	4.30 (d 1.6)	68.4	4.03 (br s)	77.5	4.08 (br s)	72.0	3.87 (br s)
6	71.5		—		72.8		77.0		69.1		—	
7	79.7	4.08 (t 1.8)	82.5	4.55 (br s)	82.0	4.08 (br s)	85.5	4.62 (br s)	83.6	3.91 (t 1.6)	86.8	4.35 (t 2.0)
8	72.8	4.30 (d 1.5)	71.5	4.44 (br s)	72.9	4.17 (br s)	71.7	4.26 (br s)	72.6	4.30 (d 1.6)	71.3	4.46 (d 2.3)
8a	59.7		60.4		59.6		60.1		59.1		59.8	
9	70.9	3.96 (s)	74.0	4.57 (s)	70.8	4.00 (s)	73.7	4.59 (s)	70.8	3.94 (s)	73.9	4.55 (s)
10	110.8		176.1		110.7		175.8		110.6		175.4	
11	65.5	4.02 (d 12.6) 4.04 (d 12.6)	65.2	3.77 (d 12.6) 4.01 (d 12.6)	65.1	3.74 (s)	66.2	3.68 (d 14.0) 3.69 (d 14.0)	25.1	1.64 (s)	24.5	1.51 (s)

^a¹³C NMR 75.5 MHz, ¹³CD₃COOD = 22.4 ppm (GN-300); ¹H NMR, CHD₂COOD = 2.06 ppm. Information in parentheses denotes multiplet and *J* in Hz. ^b¹H NMR 360 MHz (NT360) and solvent 1% CF₃COOD, 4% CD₃COOD/D₂O. ^c¹H NMR 300 MHz (GN-300), and solvent 4% CD₃COOD/D₂O. ^dUnassignable carbons.

Table 4 NMR Spectral Data of 4,9-anhydro-6-*epi*TTX, 4,9-anhydro-11-deoxyTTX, 4,9-anhydroTTX, 11-deoxy-4-*epi*TTX and 4-*epi*TTX

	4,9-anhydro-6- <i>epi</i> TTX	4,9-anhydro-11-deoxyTTX	4,9-anhydroTTX*	11-deoxy-4- <i>epi</i> TTX	4- <i>epi</i> TTX*
H-4	5.54 (s)	5.51 (s)	5.64 (s)	5.13 (d, 4.9)	5.04 (d, 5.3)
H-4a	2.87 (d, 2.3)	2.95 (d, 3.0)	3.06 (d, 4.1)	2.87 (d, 5.0)	2.73 (d, 5.3)
H-5	4.33 (dd, 2.3, 2.0)	4.15 (dd, 3.0, 2.0)	4.47 (q, 4.1, 1.1)	4.13 (d, 1.5)	3.85 (br s)
H-7	4.20 (t, 2.0)	4.01 (t, 2.0)	4.27 (q, 3.5, 1.1)	3.91 (t, 1.5)	3.98 (br s)
H-8	4.41 (d, 2.0)	4.63 (d, 2.0)	4.74 (d, 3.5)	4.29 (d, 1.5)	4.07 (br s)
H-9	4.61 (s)	4.56 (s)	4.70 (s)	3.96 (s)	4.17 (br s)
H-11	3.65 (d, 12.7) 3.67 (d, 12.7)	1.61 (s)	4.03 (d, 13.3) 4.11 (d, 13.3)	1.64 (s)	3.91 (s)

300 MHz, 4%CD₃COOD/D₂O, CHD₂COOD as 2.06 ppm (GN-300)

*300 MHz, CD₃COOD/D₂O, TMS as 0 ppm (NT-300), M.Nakamura and T.Yasumoto, *Toxicon* 23, 271, 1985.

Information in parentheses denotes multiplet and *J* in Hz
Assignments of proton signals in [] are interchangeable

Table 5 Analytical condition of an improved TTX analyzer

Column: Develosil ODS-5 (1.0 x 25 cm) (Nomura-Kagaku Co.)
 Mobile phase: 0.06N C₃F₇COOH-NH₄OH, 0.001N HOAc-NH₄OH buffer (pH5.0)
 Flow rate of mobile phase: 1.0 ml/min
 Pump for mobile phase: Hitachi L-6200
 Reaction reagent: 4N NaOH
 Flow rate of reaction reagent: 1.1 ml/min
 Pump for reaction reagent: Seishin Pharmaceutical Co., PSD 3.2)
 Reaction coil: stainless (0.5 mm x 2.5 m)
 Reaction bath: Thermo-mindor H-100 (Taiyo Scientific Industrial Co., Ltd), Silicon oil WF-30 (Wako Pure Chemical Industries LTD.)
 Reaction temperature: 135°C for TTX, 6-epiTTX, 11-norTTX-6(R)-ol
 180°C for 11-deoxyTTX
 Fluoromonitor: Hitachi F-1000, 12 µl cell)
 Excitation and emission wavelengths:
 375 nm, 500 nm for TTX, 6-epiTTX and 11-norTTX-6(R)-ol
 412 nm, 517 nm for 11-deoxyTTX
 Cooling jacket: 30 cm
 Stainless coil for the analysis of 11-deoxyTTX: 0.25 mm x 5 m

Table 6 Distribution of TTX, 6-epiTTX and 11-deoxyTTX in newts

Species	Locality		Body weight (g)	HPLC results (µg/g ± S.D., n=3)		
				TTX	6- <u>epi</u> -TTX	11-deoxy-TTX
<u>Cynops ensicauda</u>	Okinawa	adult	6.4	92±4.0*	134±4.0	14±0.5
	Japan	adult	6.6	62±2.5	81±3.5	5.5±0.2
		eft	0.5	1.3±0.1	0.4±0.1	ND
		eft	0.5	1.0±0.1	0.2±0.1	ND
		eft	0.5	1.8±0.1	0.3±0.1	ND
<u>C. pyrrhogaster</u>	Miyagi	adult	7.4	25±1.5*	25±1.3*	3.8±0.1
	Japan	adult	5.2	26±1.3	59±1.9	<2.0
		adult	9.4	32±1.4	33±1.4	3.2±0.1
<u>Taricha granulosa</u>	U.S.A.	adult	6.9	194±8.1*	<0.1	7.3±0.1+
		adult	7.0	191±7.9	<0.1	8.2±0.3
<u>Triturus alpestris</u>	Italy	adult	8.8	2.0±0.1	0.8±0.1	2.0±0.1
<u>T.oregon</u>	U.S.A.	adult	2.9	20±1.1	<0.1	4.1±0.2
<u>T.vulgaris</u>	U.S.A.	adult	0.7	15±0.5	1.3±0.1	<2.0
<u>Notophthalmus viridescens</u>	U.S.A.	adult	1.3	148±6.5*	46±2.1*	<2.0
<u>Paramesotriton hongkongensis</u>	China	adult	3.1	6.5±0.1*	<0.1	<2.0
<u>Ambystoma tigrinum</u>	U.S.A.	adult	2.0	7.5±0.3	1.0±0.1	<2.0

* identified by ¹H NMR spectroscopy and thin layer chromatography

+ identified by thin layer chromatography

ND not determined

Table 7. Distribution of TTX, 6-epiTTX and 11-deoxyTTX in tissues of adult Cynops ensicauda.

Tissue	Toxin	HPLC results ($\mu\text{g/g} \pm \text{S.D.}$, n=3)			
		Male 1	Male 2	Female 1	Female 2
Skin	TTX	66 \pm 3.1	478 \pm 11	62 \pm 2.5	48 \pm 1.7
	6- <u>epi</u> TTX	158 \pm 7.5	425 \pm 11	41 \pm 1.4	48 \pm 1.6
	11-deoxyTTX	21 \pm 0.5	25 \pm 1.2	11 \pm 0.4	15 \pm 0.6
Ovary	TTX	-	-	40 \pm 1.9	40 \pm 1.5
	6- <u>epi</u> TTX	-	-	170 \pm 8.1	221 \pm 9.5
	11-deoxyTTX	-	-	2.2 \pm 0.1	7.8 \pm 0.2
Oviduct	TTX	-	-	0.9 \pm 0.1	12 \pm 0.3
	6- <u>epi</u> TTX	-	-	3.4 \pm 0.2	19 \pm 0.8
	11-deoxyTTX	-	-	<2.0	<2.0
Testis	TTX	4.3 \pm 0.2	9.4 \pm 0.4	-	-
	6- <u>epi</u> TTX	14 \pm 0.6	19 \pm 0.9	-	-
	11-deoxyTTX	2.2 \pm 0.1	<2.0	-	-
Muscle	TTX	15 \pm 0.6	15 \pm 0.7	9.0 \pm 0.4	23 \pm 1.1
	6- <u>epi</u> TTX	40 \pm 1.7	19 \pm 0.9	8.5 \pm 0.4	32 \pm 1.4
	11-deoxyTTX	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
Viscera	TTX	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	6- <u>epi</u> TTX	5.5 \pm 0.2	3.5 \pm 0.2	5.0 \pm 0.2	4.8 \pm 0.2
	11-deoxyTTX	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
Liver	TTX	1.0 \pm 0.1	<1.0	<1.0	<1.0
	6- <u>epi</u> TTX	5.6 \pm 0.2	4.4 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2
	11-deoxyTTX	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0

Talbe 8 NMR Spectral Data of CHTX and CHTX-13,6-lactone

CHTX					CHTX-13,6-lactone	
Solvent	A	B	C		B	
	¹³ C*	¹ H*	¹ H**	¹ H**	¹³ C**	¹ H**
2	156.6	-			156.7	-
4	75.2	5.51 (d 9.4)	5.50 (d 10.0)	5.52 (d 9.3)	75.3	5.53 (d 8.5)
4a	40.5	2.31 (d 9.4)	2.31 (d 10.0)	2.28 (d 9.3)	41.7	2.16 (d 8.5)
5	73.5	4.40 (br s)	[4.39] (br s)	[4.35] (br s)	70.6	4.71 (br s)
6	72.1				84.3	
7	81.1	4.35 (br t)	[4.32] (br s)	4.35 (br s)	77.7	4.30 (br t)
8	72.7	4.40 (br s)	[4.39] (br s)	[4.39] (br s)	72.8	4.19 (d 1.5)
8a	59.3				59.5	
9	70.9	4.00 (s)	3.98 (s)	4.00 (s)	70.7	4.03 (s)
10	111.0				111.1	
11	70.3	4.90 (d 1.8)	4.94 (br s)	4.90 (br s)	69.7	5.20 (d 5.5)
12	58.1	4.27 (d 1.8)	4.32 (br s)	4.20 (br s)	-	4.85 (d 5.5)
13	174.1				173.0	

¹³CNMR *75.5 MHz (GN-300), **100 MHz (JEOL GSX-400)

¹³CD₃COOD as 22.4 ppm.

¹HNMR *300 MHz (GN-300), **400 MHz (JEOL GSX-400),
***360 MHz (360NT), CHD₂COOD as 2.06ppm (Solvent A,B),
HOD as 4.81 ppm (Solvent C)

Solvent: A 4%CD₃COOD/D₂O, B 1%TFA,
4%CD₃COOD/D₂O, C D₂O

Assignments of proton signals in [] are
interchangeable.

- Unassignable carbons

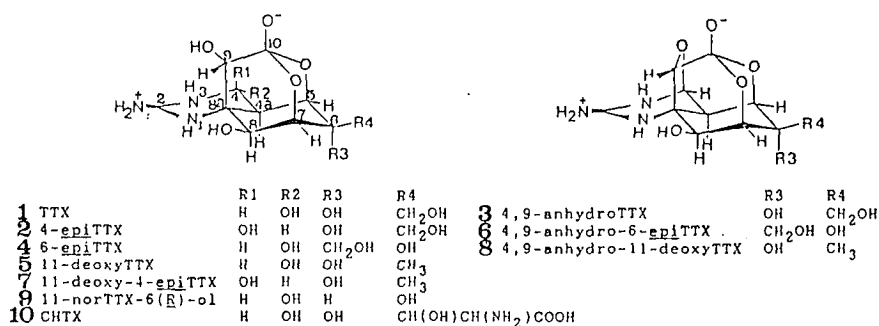


Fig. 1 Chemical Structures of Natural Analogs of TTX

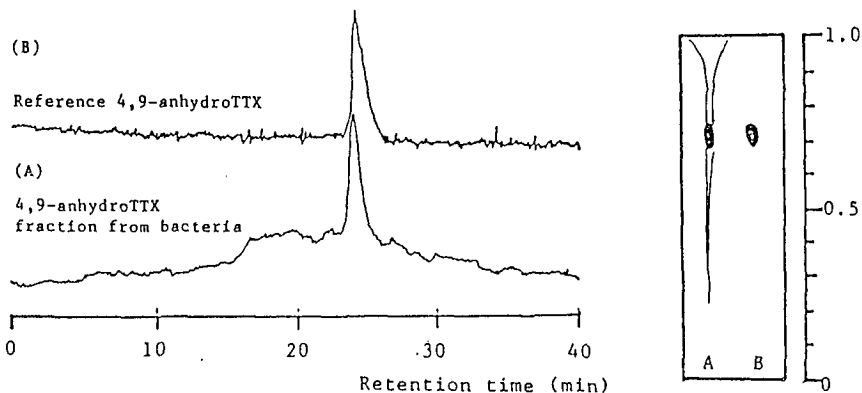


Fig. 2 Chromatograms with TTX analyzer and TLC of 4,9-anhydroTTX fraction from the bacteria isolated from fugu rubripes (A) and reference 4,9-anhydroTTX (B).

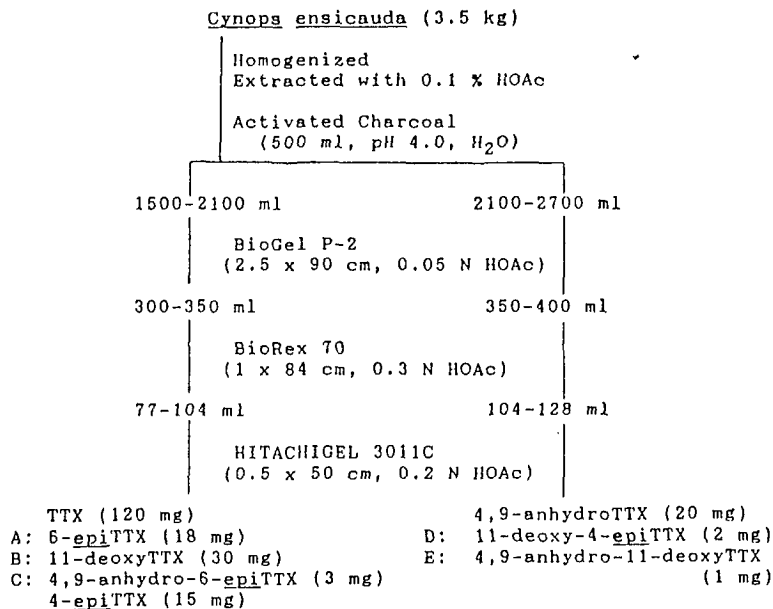


Fig. 3 Purification of TTX Analogs from Cynops ensicauda

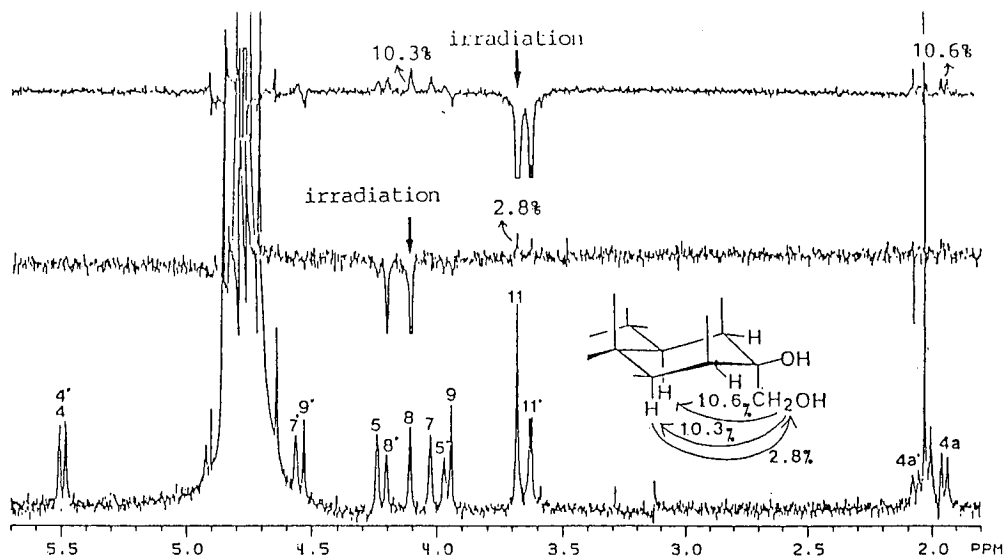


Fig. 4 360 MHz NOE difference spectra of 6-epiTTX
(4% CD₃COOD/D₂O, CHD₂COOD as 2.0 ppm, NT360)

hemilactal: without prime, 10,7-lactone: with prime

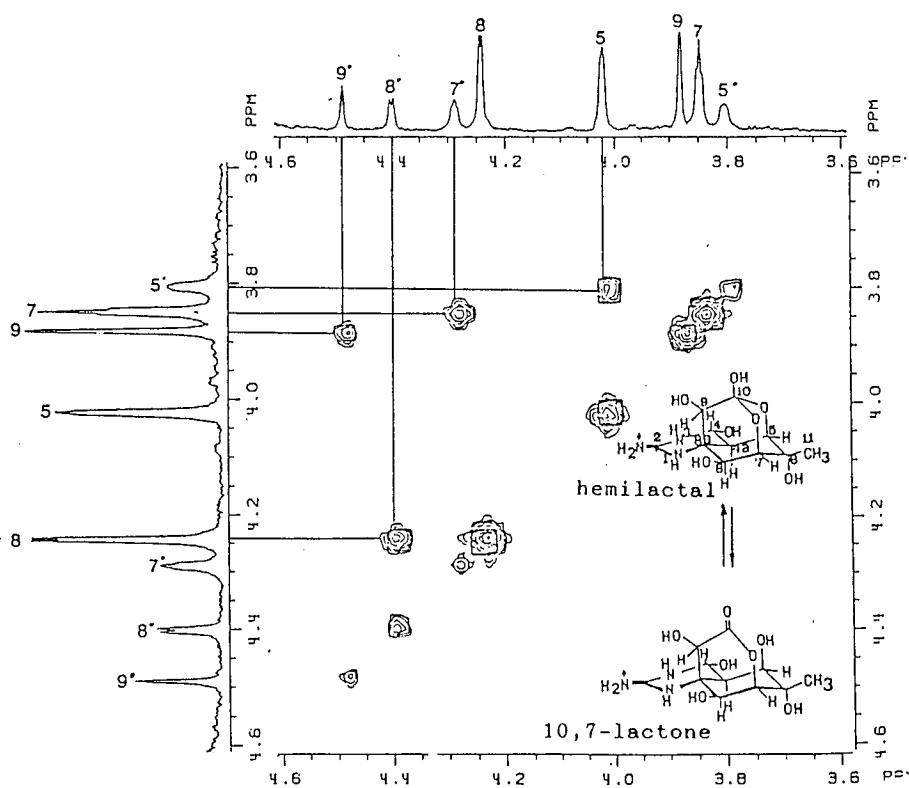


Fig. 5 300 MHz ¹H-¹H NOESY of 11-deoxyTTX.
(4% CD₃COOD/D₂O, CHD₂COOD as 2.0 ppm, GN-300)

hemilactal: without prime, 10,7-lactone: with prime

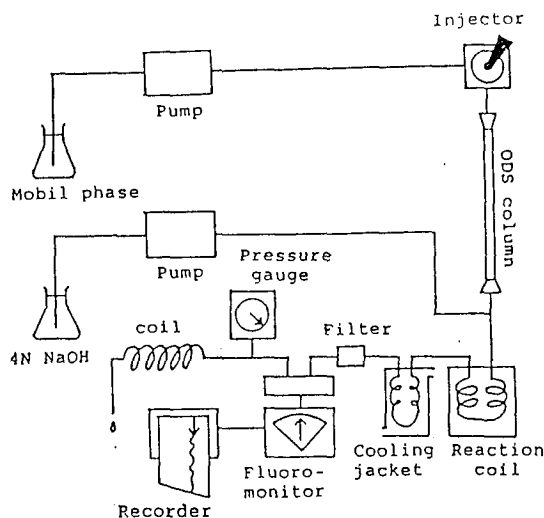


Fig. 6 Flow Diagram for the HPLC System of an Improved TTX Analyzer

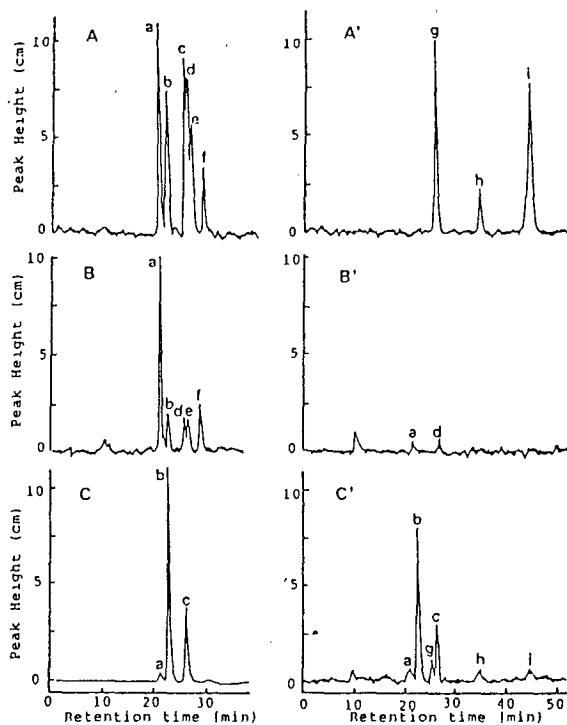


Fig. 7 Chromatograms of a Mixture of Reference Toxins (A and A') and Sample Solutions Prepared from a Puffer Liver (B and B')¹⁾ and a Newt Whole Body (C and C').¹⁾

A: Mixture of TTX (a, 106 ng), 6-*epi*TTX (b, 8.53 ng), 4,9-anhydro-6-*epi*TTX (c, 12.6 ng), 11-*nor*TTX-6(*R*)-ol (d, 142 ng), 4-*epi*TTX (e, 119 ng) and 4,9-anhydroTTX (f, 55.7 ng).

A': Mixture of 11-deoxyTTX (g, 200 ng), 4-*epi*-11-deoxyTTX (h, 181 ng) and 4,9-anhydro-11-deoxyTTX (i, 181 ng).

B and B': Injected amounts were equivalent to 5 mg and 10 mg of puffer (*Fugu niphates*) liver, respectively. C and C': Injected amounts were equivalent to 5 mg and 10 mg of the newt (*Cynops ensicauda*) whole body, respectively.¹⁾

The reaction temperature, and the excitation and emission wavelengths of the fluoromonitor were set at 135°C, and 375 and 500 nm for A, B and C; and at 180°C, and 412 and 517 nm for A', B' and C'. The range of the fluoromonitor was set at 10, except for C (range 1).

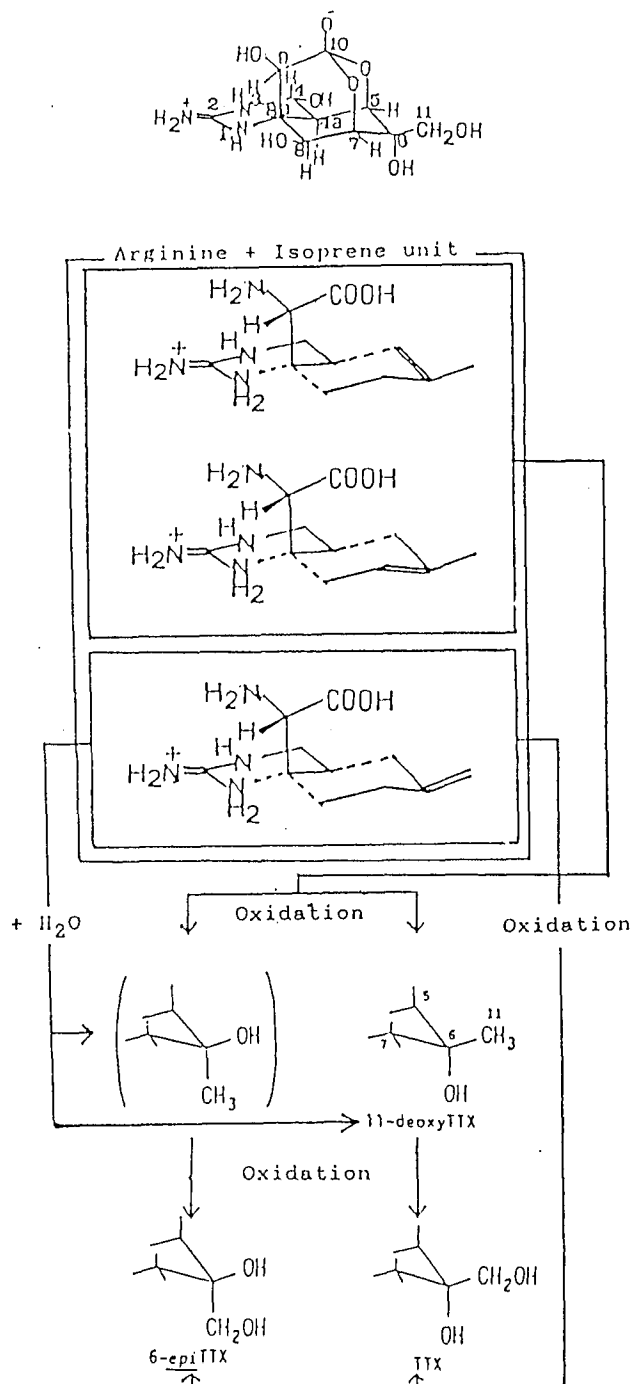


Fig. 8 Probable hypothesis of biosynthetic and metabolic pathway of TTX

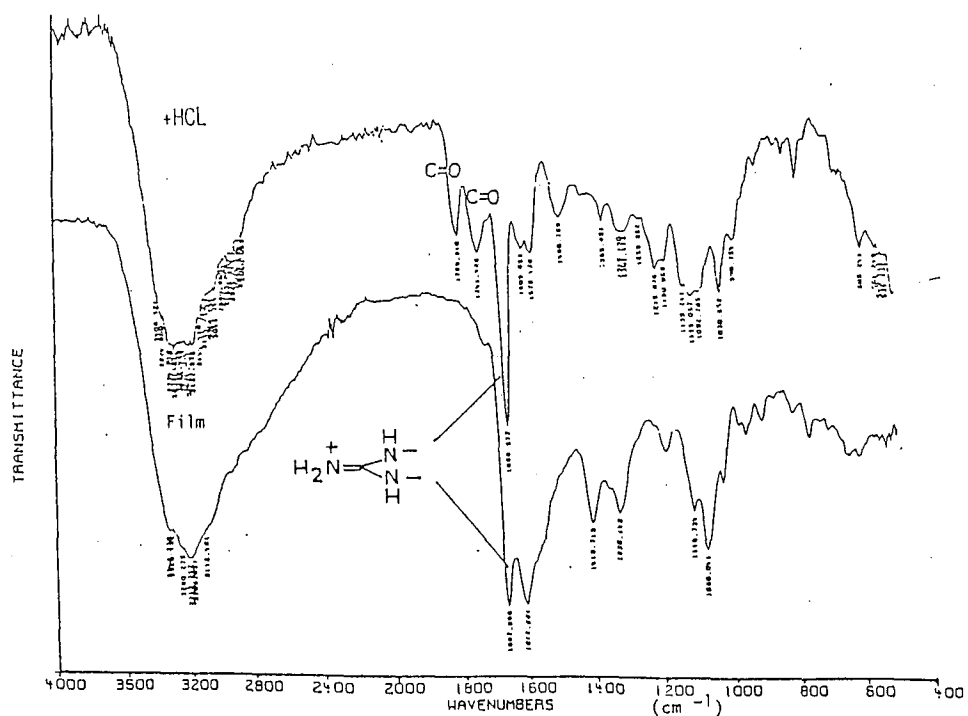


Fig. 9 FT-IR spectra of CHTX

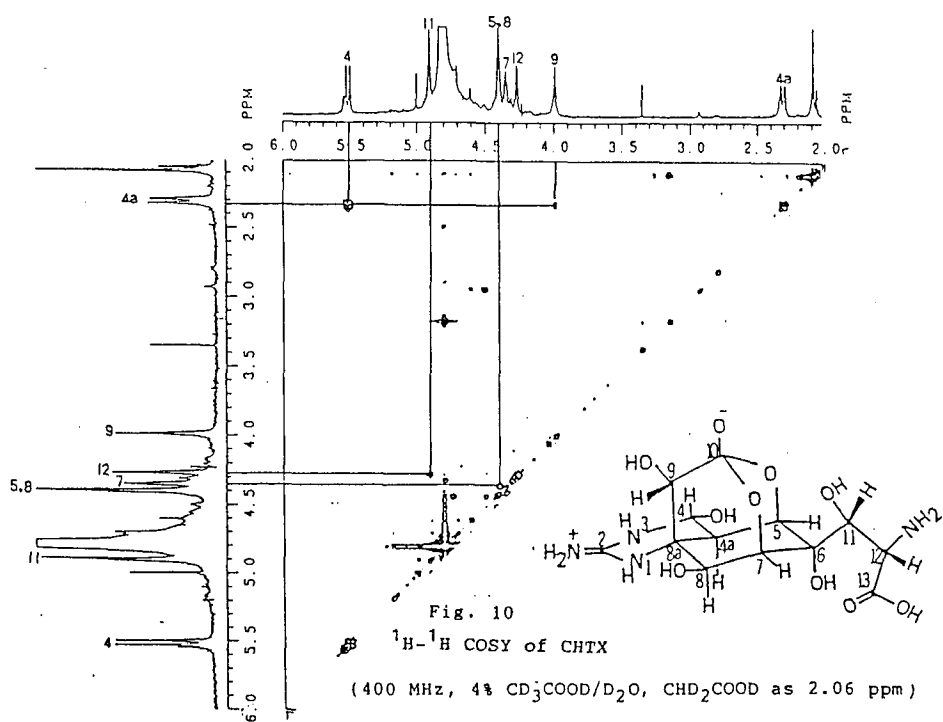


Fig. 10
 ^1H - ^1H COSY of CHTX
 (400 MHz, 4% $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$, CHD_2COOD as 2.06 ppm)

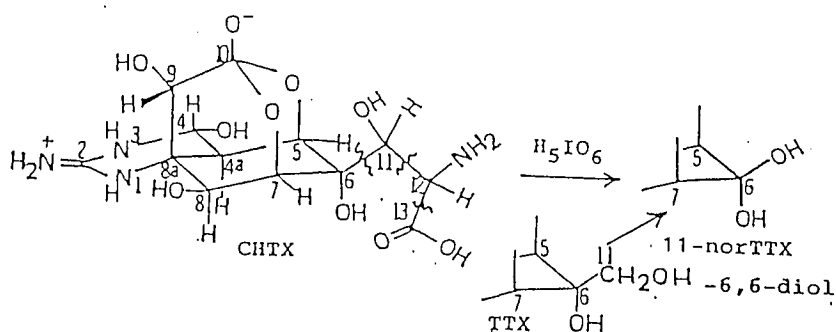


Fig. 11 H_5IO_6 Oxidation of TTX and CHTX

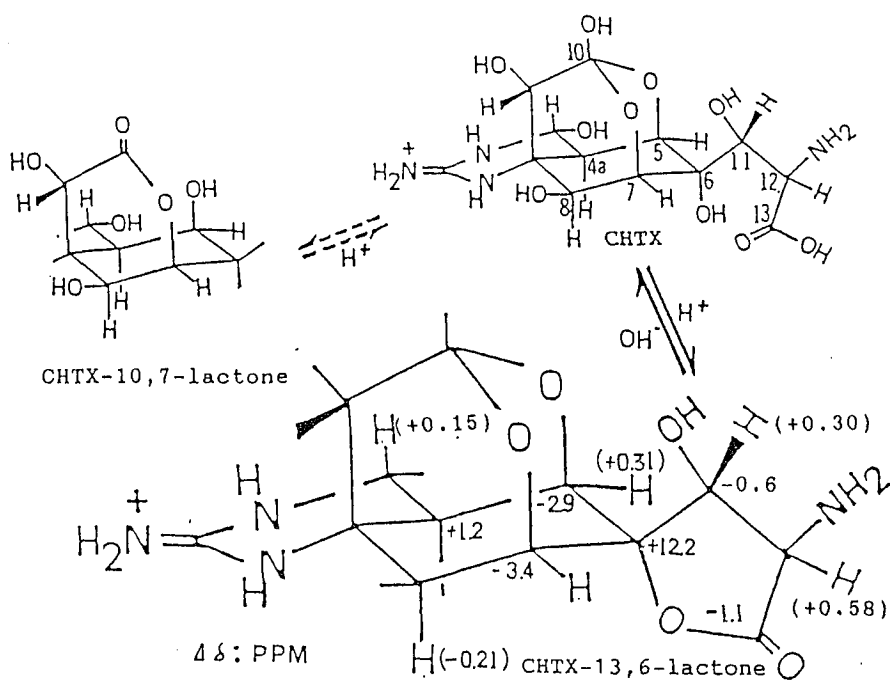
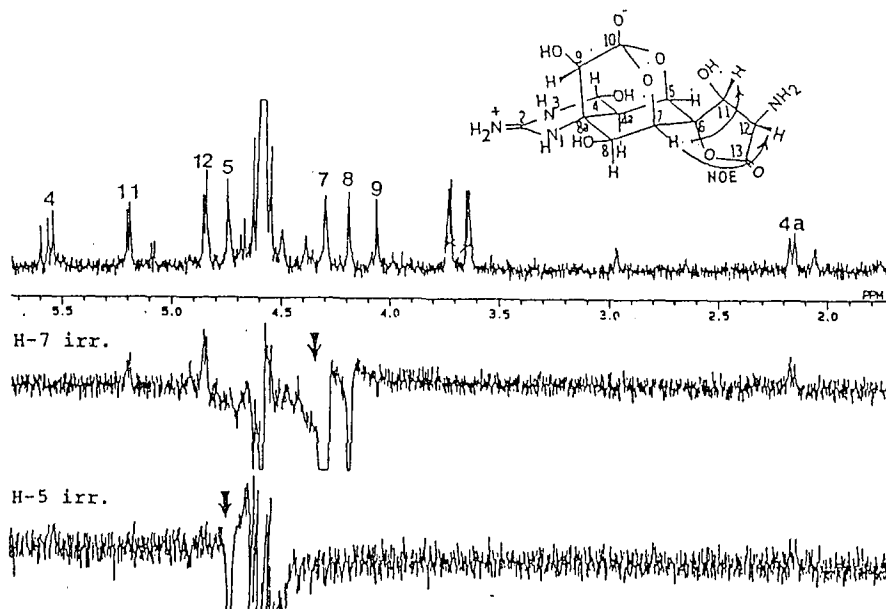
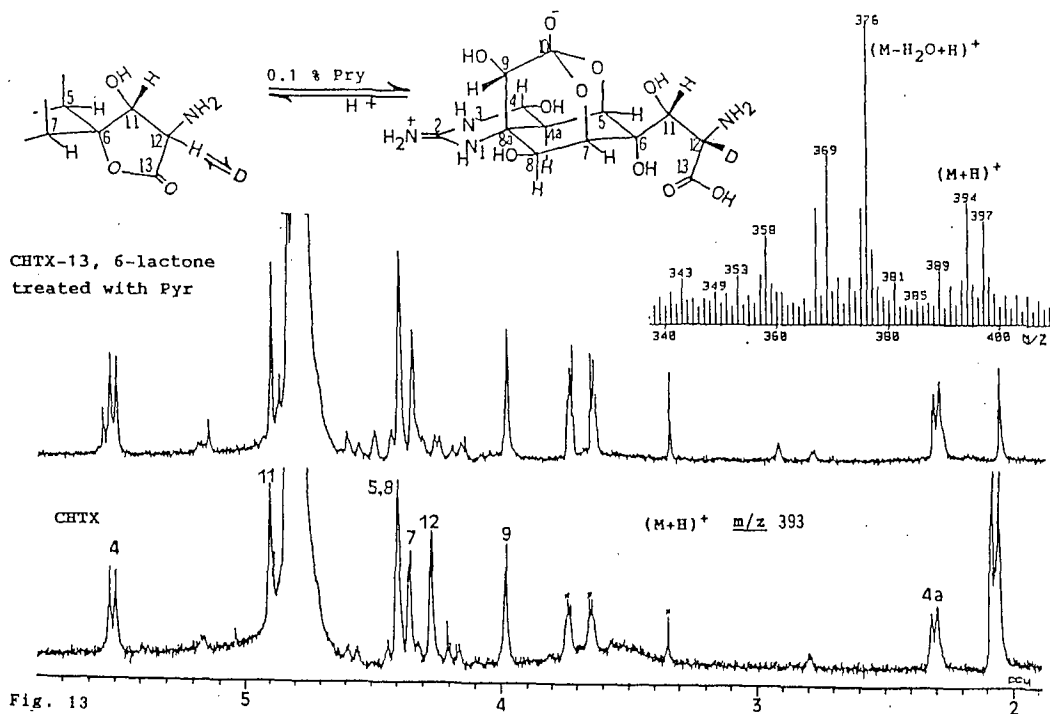


Fig. 12 The shift-of-shift-value of CHTX-13,6-lactone to CHTX

1H NMR spectra: in parenthesis , more than 0.1 ppm

^{13}C NMR spectra: more than 1.0 ppm



審査結果の要旨

フグ毒テトロドトキシンによる食中毒は致命率が高く、わが国で発生する全食中毒死者数の50～80%を占めている。近年、フグの消費量は増大の一途にあり、従来は食用の対象と見なされなかった種類のフグや、輸入種にまで消費が拡大している。したがって、フグ関連食品の安全性を確保することは極めて重要である。フグ中のテトロドトキシン含量には著しい個体差や地域差があり、テトロドトキシンの起源や生合成経路が不明なこととあいまって毒性の予測が困難であった。また、毒性の検出や定量の手段もマウス致死時間測定法を使用しており、実験動物の入手管理や、精度等に問題があった。

本研究では、まず、テトロドトキシンの起源追及に着手し、フグ消化管と皮膚から分離した細菌がテトロドトキシンを生産する事実を、HPLC、TLC、GC-MS等の各種の分析学的手法を駆使して証明した。このことによって、フグ中のテトロドトキシンが外因性の起源を有することが明らかになり、毒性の個体差や地域差を説明することができた。

ついで、テトロドトキシンの生合成や代謝経路を天然同族体の面から追究した。蛍光-HPLC分析による予備調査の結果、同族体の存在の可能性のもっとも高かったシリケンイモリを試料として、7種の同族体を単離し、最新の分光学的手法を駆使して構造を決定した。中でも、11-デオキシ体、6-エピ体は、テトロドトキシンの生合成経路がアルギニンとイソプレニユニットを出発とすることを示唆する重要な化合物であった。さらに、中米産の矢毒蛙から14年前に発見されたテトロドトキシン同族体で、生理学上重要な試薬である構造不明毒チリキトキシンを単離し、NMR主体とする分光学的手法と化学反応によって、構造を決定した。

以上の成果は、毒の起源と分析法を確立して食品衛生の面で貢献したばかりでなく、新奇同族体の発見や分光学的な手法による構造決定の点で天然物化学の面でも高く評価される。さらに、これらの新奇同族体は、Naチャンネルの構造と機能を解析する上でも貴重な試薬となることが立証されており、生化学、生理学、薬理学等の広い分野に貢献すると予想される。よって本論文を農学博士号授与に値するものであると判定した。